

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003－62401
(P2003－62401A)

(43)公開日 平成15年 3 月 4 日(2003.3.4)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマト*(参考)
B 0 1 D 15/00		B 0 1 D 15/00	G 2 G 0 4 5
	57/02	57/02	K 4 B 0 2 9
B 0 1 J 20/10		B 0 1 J 20/10	4 B 0 6 3
20/34		20/34	A 4 C 0 5 7
			E 4 D 0 1 7
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－253450(P2001－253450)	(71)出願人 000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
(22)出願日	平成13年 8 月23日(2001.8.23)	(71)出願人 000005810 日立マクセル株式会社 大阪府茨木市丑寅 1 丁目 1 番88号
		(72)発明者 西矢 芳昭 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株 式会社敦賀バイオ研究所内
		(74)代理人 100080791 弁理士 高島 一
		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体物質の精製方法および精製装置

(57)【要約】

【課題】 安価に且つ簡便な方法で、生体物質を含有する試料から生体物質を精製するための方法を提供すること。

【解決手段】 生体物質結合用担体と生体物質を含有する試料および生体抽出用溶液を混合する工程、生体物質結合用担体を液体から分離する工程、および、電場中にて生体物質結合用担体から生体物質を遊離する工程を含む方法により、生体物質を精製する。これにより、生体物質の電気的性質に応じて担体から該生体物質を遊離させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程を含むことを特徴とする、特定の生体物質を精製する方法。

- a) 該生体物質を保持することのできる担体に該生体物質を含有する試料を接触させ、
- b) 該生体物質を保持した担体を試料から分離することにより夾雑物質を除去し、
- c) 該担体を含む系を電場におき生体物質の電気的性質に応じて担体から該生体物質を遊離させる。

【請求項2】 生体物質が核酸である請求項1記載の方法。 10

【請求項3】 生体物質が蛋白質である請求項1記載の方法。

【請求項4】 担体が磁性を有する物質を含むことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 担体がシリカを含むことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 特定の生体物質を精製するための装置であって、

- a) 該生体物質を保持することのできる担体に該生体物質を含有する試料を接触させる手段、および／または、
- b) 該生体物質を保持した担体を試料から分離する手段、を有し、かつ、
- c) 該担体を含む系に電場を発生させる手段、を有することを特徴とする装置。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、目的とする生体物質、特に核酸、を含有する試料から生体物質を抽出または精製するため、特定の生体物質を保持することのできる担体（以下、「生体物質結合用担体」という）に生体物質を保持させ、担体を分離後、担体から生体物質を遊離させる方法、ならびにそのための装置に関する。本発明は、通常の方法に比較し、精製された生体物質を高収率に得ることが可能となる。また、本発明によって、生体物質の調製を小スケールで効率良くおこなうことも可能となる。 30

【0002】

【従来の技術】従来より、特定の生体物質を保持することのできる担体、特に固相担体を用いて生体物質を抽出精製することは極一般的な手法として用いられてきた。例えば、蛋白質の精製にゲルマトリックスや珪藻土、あるいはメンブレンなどの固相担体を用いることは、説明するまでもなく古くより定法としておこなわれている。特に、核酸の抽出精製においては、核酸結合性固相担体を利用した手法が近年急速に普及しつつある。 40

【0003】核酸を含有する細胞等の生物材料からの核酸の抽出精製は、遺伝子工学や臨床診断の分野では重要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞等の 50

生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA/RNA診断においても、血液等の生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、検出することが必要である。

【0004】一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAといった核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、蛋白質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身も蛋白質との複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破碎処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を施すことにより核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破碎物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている[Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]。 20

【0005】しかし、これらの方法は遠心分離など煩雑な工程を含むため非常に手間がかかる作業である。さらに、これらの方法により抽出された核酸サンプル中には、その後の解析にとって弊害となる蛋白質などの夾雑物質が多く含まれている。そのため、純度よく核酸を得るためには、これらの抽出操作を行った後に塩化セシウム等による密度勾配を利用した超遠心分離操作やフェノール/クロロホルム抽出に代表されるような煩雑で、かつ長時間を要する蛋白質除去操作を行う必要がある。

【0006】一方、簡便な核酸抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法がある（特開平2-289596号公報）。この方法は、バクテリアなどの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能なおえ、溶出液として水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、特別な脱塩濃縮操作が不要で、抽出した核酸を直ちに後の解析に使用することができるという利点がある。しかしながら、本方法でシリカより溶出させて得られた核酸は濃度が低く、収量においても満足できるものではなかった。従って、少量の核酸で分析が可能なポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）などには適用できるが、サザンハイブリダイゼーションやノーザン・ブロットなどの分析には大スケール化とその後の濃縮工程という煩雑な操作を必要とした。更に簡便性を高めた核酸抽出方法として核酸結合用磁性担体を使用する核酸単離方法があり、例えば核酸が共有結合し得る重合性シラン被膜により覆われた超常磁性酸化鉄核を有する磁気応答粒子を利用することが知られて 50

いる（特開昭60-1564号公報）。しかしながら、本方法も溶出させて得られた核酸の濃度、収量における不満を解消できるものではなかった。

【0007】以上のように、非特異的に多量の核酸を簡便に抽出精製するには、種々の問題があった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】このような理由から、安価で簡便に多量の生体物質、特に核酸を抽出精製できる方法が求められていた。すなわち本発明の目的は、安価に且つ簡便な方法で生体物質を含有する試料から生体物質を精製するための方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】我々は、生体物質結合用担体と生体物質を含有する試料および生体抽出用溶液を混合する工程、生体物質結合用担体を液体から分離する工程、および生体物質結合用担体から生体物質を遊離させる工程を含む生体物質単離方法において、生体物質結合用担体を含む系を電場におくことにより担体から多量の精製された生体物質を遊離させることが可能となることを見出し、本発明に至った。

【0010】例えば核酸については、これまで、核酸結合用担体に結合あるいは吸着している核酸は所定のバッファーや水によりほとんど全てが溶出すると考えられてきたため、核酸の収量が低い理由は核酸結合用担体の核酸結合能が低いことによるものと思われていた。従って、核酸結合用担体の材質、粒形、表面積などに種々の改良が施されてきた（特開平2-289596号公報、特公平7-13077号公報、特開平9-12929号公報）。しかしながら、我々は種々の検討をおこない、核酸結合用担体に結合あるいは吸着している核酸の状態により所定のバッファーや水によっても溶出が困難であることを見いだした。更に、核酸がリン酸結合骨格を有するため負の電荷を持つことを利用し、核酸結合用担体を含む系を電場におくことで核酸結合用担体から核酸を高収率で遊離させることを可能とした。

【0011】すなわち本発明は、以下の構成からなる。

（1）以下の工程を含むことを特徴とする、特定の生体物質を精製する方法。

a）該生体物質を保持することのできる担体に該生体物質を含有する試料を接触させ、

b）該生体物質を保持した担体を試料から分離することにより夾雑物質を除去し、

c）該担体を含む系を電場におき生体物質の電気的性質に応じて担体から該生体物質を遊離させる。

（2）生体物質が核酸である（1）記載の方法。

（3）生体物質が蛋白質である（1）記載の方法。

（4）担体が磁性を有する物質を含むことを特徴とする（1）～（3）のいずれかに記載の方法。

（5）担体がシリカを含むことを特徴とする（1）～

（4）のいずれかに記載の方法。

（6）特定の生体物質を精製するための装置であって、

a）該生体物質を保持することのできる担体に該生体物質を含有する試料を接触させる手段、および／または、

b）該生体物質を保持した担体を試料から分離する手段、を有し、かつ、

c）該担体を含む系に電場を発生させる手段、を有することを特徴とする装置。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明に係る方法により精製される生体物質としては、いずれかの固相担体に可逆的に結合し、かつ、正または負のいずれかに荷電しており、電気的性質により担体から遊離しうるものであれば特に制限はない。このような生体物質として、核酸、蛋白質、多糖、脂質等が挙げられ、好ましくは核酸、蛋白質である。

【0013】本発明に係る方法において生体物質結合用担体を含む系を電場におき、担体から生体物質を遊離させる手段については特に問わないが、生体物質や担体の性状を損なわない緩やかな条件であることが好ましい。例えば、電解質溶液により浸漬されたゲルマトリックス中の溝に核酸が結合した固相担体を注入し、ゲルマトリックスに10～200V程度の電圧で通電することにより、固相担体はゲルマトリックス内を移動せず核酸のみ正極方向に移動することで固相担体と核酸を分離し、精製された核酸を得ることができる。また、適当な孔を有するメンブレンを利用することもできる。すなわち、核酸が結合した固相担体を含む液をメンブレンで覆い、適当な電圧で通電することにより、固相担体から核酸が遊離し精製された核酸を回収することができる。

【0014】生体物質結合用担体を含む系に電場をかけるための装置としては、何ら特別な機器を必要としない。例えば、核酸や蛋白質を分離分析するための市販の電気泳動装置やパワーサプライをそのまま用いることができる。しかしながら、本方法による生体物質の精製を機能的におこなうためには、分注機構、電極、固液分離機構等を備えた自動化装置がより有用である。これらの機構を備えた自動化装置の作製は、従来技術により十分可能であり、該自動化装置もまた本発明の実施の一態様である。

【0015】本発明に係る方法に使用する生体物質結合用担体は、生体物質を結合あるいは吸着する担体であれば非共有結合、イオン結合、物理吸着などいずれの様式によるものであっても問題は無い。しかしながら、生体物質と担体上の官能基とが共有結合している場合、生体物質の回収には工夫を要する。具体的な生体物質結合用担体としては、各種ゲルマトリックスや珪藻土、多糖体粒子、シリカ粒子やポリマー担体をシリカで被覆したものの、磁性を有する物質、例えば、磁性を有する金属酸化物をシリカで被覆した磁性シリカ粒子などを挙げるこ

ができる。

【0016】本発明に係る方法に使用する生体物質を含有する試料は、蛋白質、膜、DNAまたはRNA、低分子量核酸などを含む生物材料である。このような生物材料としては、蛋白質、膜、DNAまたはRNA、低分子量核酸などを含むバクテリオファージ、ウイルス、細菌あるいはこれらの組み合わせが例示される。また、精製する目的のために、この生体物質がプラスミドまたは増幅産物中の核酸であってもよい。

【0017】本発明の好ましい実施形態のひとつとして、細胞などの核酸含有試料からの核酸の精製について以下に詳述する。すなわち、本方法は、固相担体である核酸結合用担体と核酸を含有する試料および核酸抽出用溶液を混合する工程；核酸が結合した核酸結合用担体を液体から分離する固液分離工程；および、核酸が結合した担体を含む系を電場におき核酸結合用担体から核酸を遊離させる工程を含む。

【0018】核酸結合用担体、核酸を含有する試料、および核酸抽出用溶液を混合する工程は、例えば市販のボルテックスミキサー等を用いて行われ得る。この工程は、チューブを軽く転倒攪拌あるいは振盪することによっても十分に行われ得る。担体としては、上述のもののいずれを使用してもよいが、好ましくはシリカ粒子または表面を被覆した粒子、より好ましくは磁性シリカ粒子である。

【0019】本発明で使用する核酸抽出用溶液としては、カオトロピック物質、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、トリス塩酸などを含有するバッファーが挙げられる。カオトロピックイオンの存在下で、核酸はシリカ粒子等の担体に特異的に吸着し、他の細胞成分と分離される。カオトロピック物質としては、グアニジン塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、（イソ）チオシアン酸ナトリウム、尿素などが例示される。それらは組合わせて使用してもよい。その濃度は、約1～10モル/L程度が好ましい。本発明における好ましい核酸抽出用溶液には、例えば、グアニジンチオシアン酸塩、Triton X-100、トリス/塩酸緩衝液が含まれる。核酸を最終的に遊離し回収するために、TE緩衝液、滅菌水などの遊離用緩衝液が用いられ得る。

【0020】核酸が結合した担体を液体から分離する固液分離工程は、遠心分離やフィルター分離によって行われ得るが、磁性粒子を核酸結合用担体として用いる場合は磁界、すなわち磁石を用いて行われ得る。この磁石は、例えば、磁束密度が約300ガウスの磁石が用いられ得る。具体的には、核酸結合磁性担体、核酸を含有する試料、および核酸抽出用溶液を含むチューブの側壁に磁石を近づけ、核酸結合担体をチューブ側壁に集め、核酸抽出用溶液などの溶液と分離する方法がある。

【0021】核酸が結合した担体を含む系を電場におき、核酸結合用担体から核酸を遊離させる工程は、核酸

が結合した担体を、例えば70%エタノールで数回洗浄した後、担体を乾燥し、その後、担体を上述のようにゲルマトリックス中の溝に注入して通電することにより行うことができる。あるいは、担体に滅菌水やTE緩衝液などの低イオン濃度の溶液を添加した後、単体を含む液を上述のようにメンブレンで覆い、通電することにより行うこともできる。ゲルマトリックスまたはメンブレンに捕捉された核酸は周知の手段により回収される。

【0022】磁性体粒子を用いた蛋白質の精製、具体的には酵素や抗体の精製方法も既に公知であり、試薬キットも既に販売されている（Mag Extractor-His-tag（東洋紡績製））。従って、蛋白質、特に組換え蛋白質の精製においても、上述した核酸の精製に準じた方法を容易に適用することが可能である。

【0023】磁石を用いた磁性体粒子の固液分離システムは自動化も容易であり、実際、自動化装置が既に開発、販売されている（MF X-2000、MF X-6000、MF X-9600（東洋紡績製））。従って、これらの装置と本発明に係る方法を組合せることにより、生体物質を高収率にハイスループット精製することも容易に実現できる。

【0024】本発明の一態様は、生体材料から所望の生体物質を高収率で取得する方法である。本発明の一態様は、生体材料から所望の生体物質を簡便且つ安価に取得する方法である。また、本発明の別な態様は、核酸精製や蛋白質精製、ゲノムや機能性蛋白質の配列解析、変異解析などの研究に関する装置である。

【0025】本発明を使用することにより、今までの技術では高収率に精製することが困難であった生体物質の簡便な調製が可能となりうる。また、種々の生体物質の解析方法への材料供給において効率よく目的の生体物質を調製することが可能となる。

【0026】

【実施例】以下、本発明の実施例として核酸の抽出精製における適用例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとするが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0027】【実施例】核酸結合用固相担体として市販の磁性シリカ粒子（Mag Extractor-PCR & Gel Clean Up：東洋紡績製）を用いた。本磁性シリカ粒子は、磁性金属酸化物として酸化鉄を用い、これをシリカで被覆したものである。核酸を含有する試料としては、大腸菌（Escherichia coli JM109（東洋紡績、宝酒造、インビトロジェンなどより販売されている））3mLをTB培地/試験管にて37℃で、20時間培養した菌体を用いた。核酸抽出用溶液としては、カオトロピック物質を含む緩衝液としてバッファーA（7Mのグアニジン塩酸塩（ナカライテスク社）、50mMのTris-HCl（シグマ社）、pH7.5）を用いた。核酸の溶出は、

10

20

30

40

50

蒸留水を121℃、20分間の処理により滅菌した滅菌水を用いた。

【0028】核酸の抽出精製は以下の手順にておこなった。

(1) 菌体濁度(OD660)を測定し、任意の量(OD660; 1.0~2.0)の菌体を遠心分離により調製した。この菌体と任意の量の磁性シリカ粒子(4.1~66μL)および1mLのバッファーAを5分間混合し、試料からの核酸の遊離と磁性シリカ粒子への核酸の結合を同時におこなった。

(2) 次に核酸が結合した磁性シリカ粒子を、永久磁石を用いて蛋白質や膜成分などの夾雑物質を含む液体から分離する固液分離をおこなった。得られた磁性シリカ粒子は、1mLのバッファーAにて洗浄し、再度永久磁石により固液分離した。

(3) 核酸が結合した磁性シリカ粒子を100μLの滅菌水に懸濁し、懸濁液を調製した。

(4) 懸濁液を1%アガロースゲル(ナカライテスク社)にアプライし、簡易電気泳動装置(GelMate 2000(東洋紡績製))を用いて、製造者のプロトコールに従いTAEバッファー中で100V、80分間通電し、核酸を遊離させた。

【0029】実施例によって得られた核酸(大腸菌の染色体DNA)の回収量を電気泳動によって確認した結果を、図1および図2に示す。図1においては磁性シリカ粒子の量を33μLに固定し、菌体量をOD660; 1.0~2.0の間で変えて核酸収量を評価した。図2においては菌体量をOD660; 4.0に固定し、磁性シリカ粒子の量を4.1~66μLで変えて核酸収量を評価した。

【0030】[比較例] 上記実施例の比較例として、従来の核酸調製方法を対比できる手順で実施した。手順を以下に示す。(1)~(2)は実施例と同じである。

(1) 菌体濁度(OD660)を測定し、任意の量(OD660; 1.0~2.0)の菌体を遠心分離により調製した。この菌体と任意の量の磁性シリカ粒子(4.1~66μL)および1mLのバッファーAを5分間混合し、試料からの核酸の遊離と磁性シリカ粒子への核酸の結合を同時におこなった。

(2) 次に核酸が結合した磁性シリカ粒子を、永久磁石を用いて蛋白質や膜成分などの夾雑物質を含む液体から分離する固液分離をおこなった。得られた磁性シリカ粒子は、1mLのバッファーAにて洗浄し、再度永久磁石により固液分離した。

(3) 核酸が結合した磁性シリカ粒子を100μLの滅菌水に懸濁し、核酸を滅菌水に遊離させた後、永久磁石により固液分離をおこない核酸溶液を調製した。

【0031】比較例によって得られた核酸(大腸菌の染色体DNA)の回収量を電気泳動によって確認した結果も、実施例同様に図1および図2に示す。図において明らかなように、本発明に係る方法により核酸を抽出精製した実施例では、従来方法により核酸を抽出精製した比較例と比して大幅に核酸収量が増加した。実施例と比較例の手順の違いは、核酸結合用担体を含む系を電場におき核酸を遊離させる点のみである。結果として、核酸を含有する試料から核酸を精製するための方法として本発明に係る方法の有用性が示された。

【0032】

【発明の効果】本発明により、今までの技術では困難であった、担体を利用した多量の生体物質の抽出精製が可能となる。これにより、安価に且つ簡便な方法で生体物質を含有する試料から生体物質を調製することが可能となる。また、本方法の優位性を活かして、生体物質の抽出精製の自動化、ハイスループット化、μ-TAS(Micro Total Analysis System)への応用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例および比較例によって得られた核酸の回収量を電気泳動によって確認した結果を示す泳動ゲルの写真である。磁性シリカ粒子の量を33μLに固定し、菌体量をOD660; 1.0~2.0の間で変えて核酸収量を確認した。

【図2】実施例および比較例によって得られた核酸の回収量を電気泳動によって確認した結果を示す泳動ゲルの写真である。菌体量をOD660; 4.0に固定し、磁性シリカ粒子の量を4.1~66μLで変えて核酸収量を確認した。

【図1】

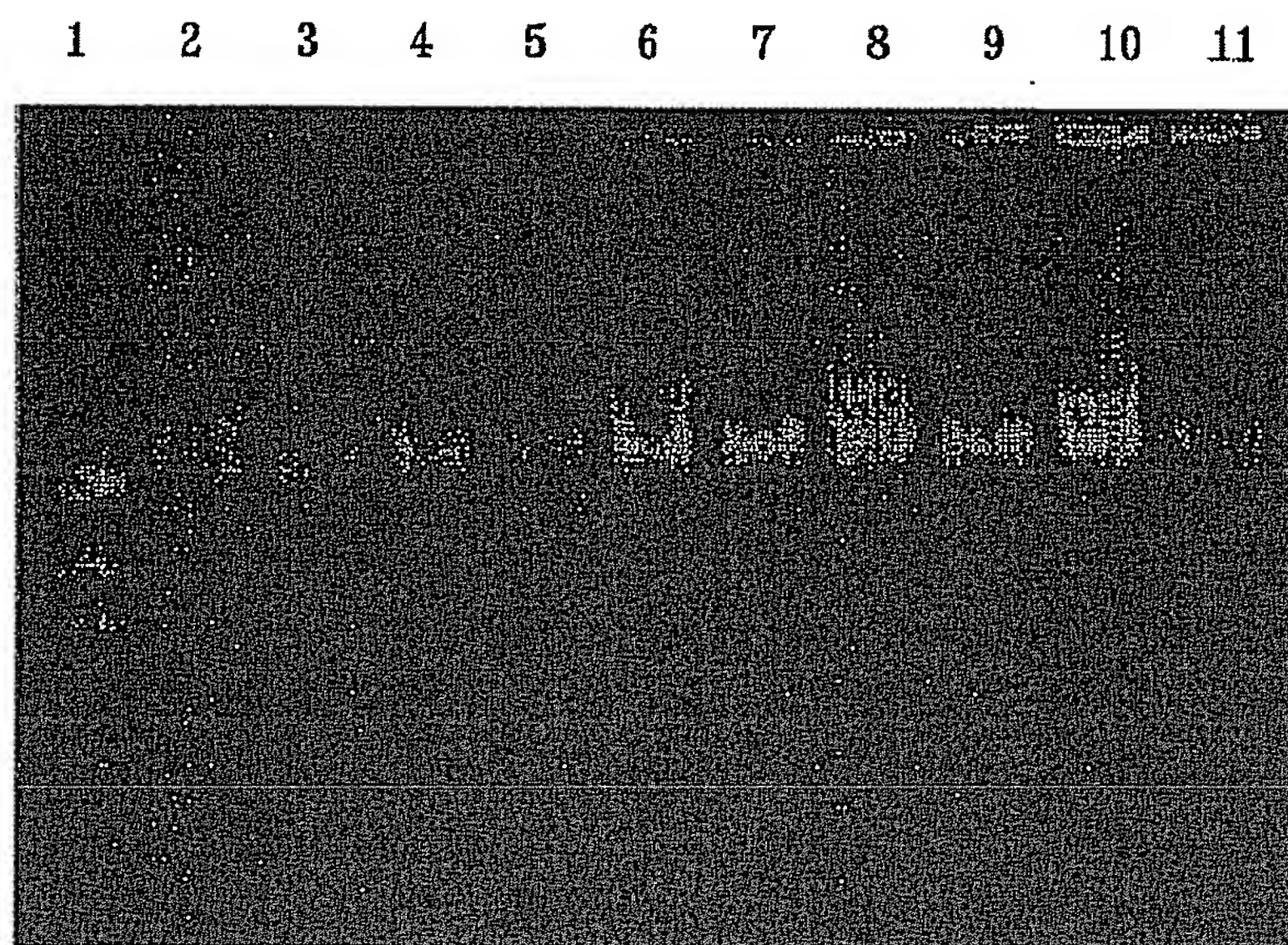


図1 Lane 1: λ -HindIII marker, lane 2: 実施例 (OD660=1.0), lane 3: 比較例 (OD660=1.0), lane 4: 実施例 (OD660=2.0), lane 5: 比較例 (OD660=2.0), lane 6: 実施例 (OD660=4.0), lane 7: 比較例 (OD660=4.0), lane 8: 実施例 (OD660=8.0), lane 9: 比較例 (OD660=8.0), lane 10: 実施例 (OD660=20), lane 11: 比較例 (OD660=20) .

【図2】

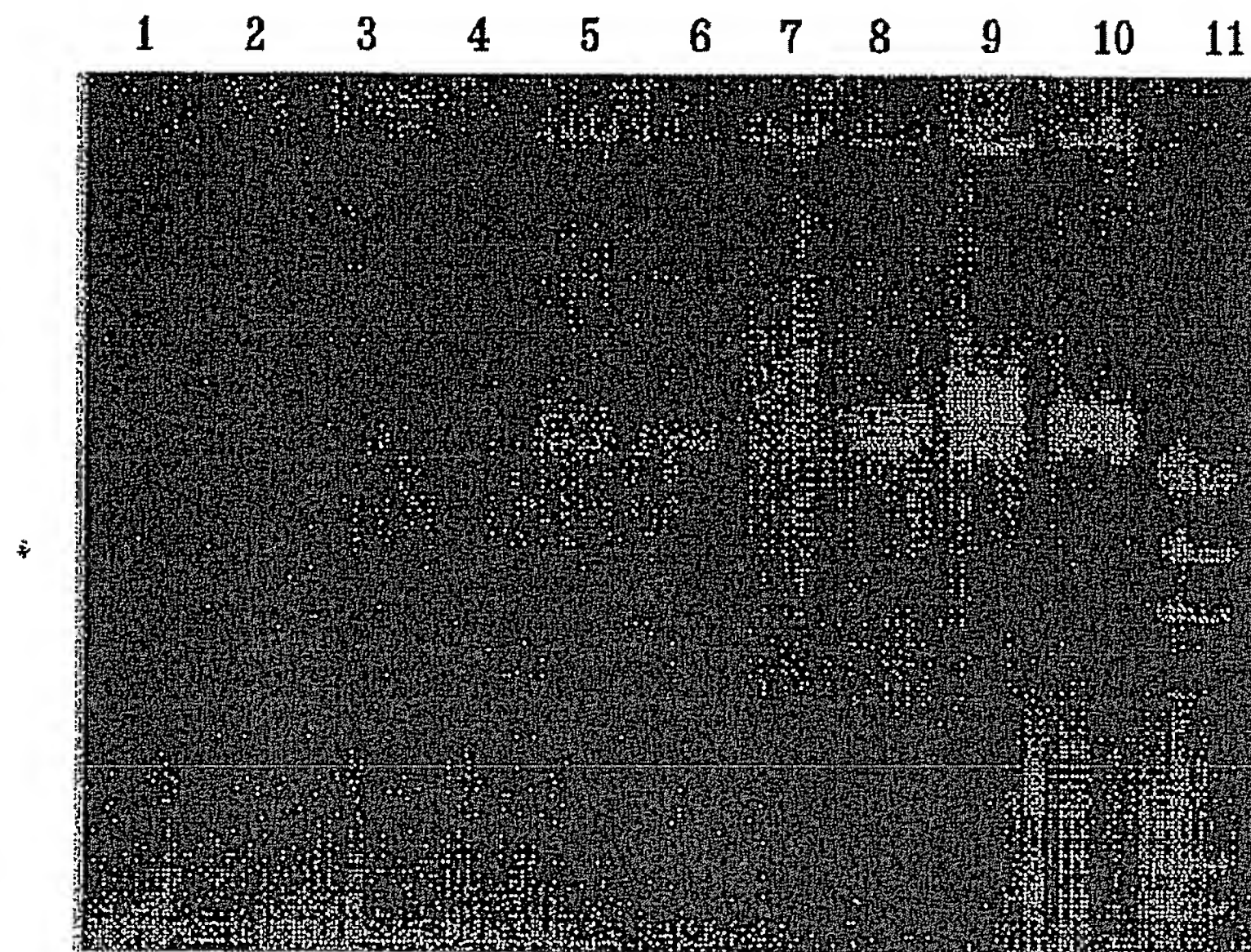


図2 Lane 1: 実施例 (磁性粒子 $4.1\mu\text{L}$) , lane 2: 比較例 (磁性粒子 $4.1\mu\text{L}$) , lane 3: 実施例 (磁性粒子 $8.2\mu\text{L}$) , lane 4: 比較例 (磁性粒子 $8.2\mu\text{L}$) , lane 5: 実施例 (磁性粒子 $16.5\mu\text{L}$) , lane 6: 比較例 (磁性粒子 $16.5\mu\text{L}$) , lane 7: 実施例 (磁性粒子 $33.0\mu\text{L}$) , lane 8: 比較例 (磁性粒子 $33.0\mu\text{L}$) , lane 9: 実施例 (磁性粒子 $66.0\mu\text{L}$) , lane 10: 比較例 (磁性粒子 $66.0\mu\text{L}$) , Lane 11: λ -HindIII marker.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)		
B 0 3 C	5/00	B 0 3 C	5/00	Z	4 D 0 5 4
	5/02		5/02		4 G 0 6 6
C 0 7 H	1/06	C 0 7 H	1/06		4 H 0 4 5
	21/04		21/04	A	
C 0 7 K	1/22	C 0 7 K	1/22		
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00	A	
G 0 1 N	30/00	G 0 1 N	30/00	A	
	30/48		30/48	E	
	33/48		33/48	K	
	33/483		33/483	A	
				F	
// C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/02		
G 0 1 N	27/447	G 0 1 N	27/26	3 1 5 Z	

(72)発明者 岸本 幹雄
茨城県筑波郡谷和原村絹の台 6 - 20 - 1
日立マクセル株式会社開発本部内

F ターム(参考) 2G045 BB51 CB21 DA13 DA36 FA29
FB05 FB15 GC10
4B029 AA23 BB15 BB20 CC01
4B063 QA01 QQ06 QQ42 QQ52 QR32
QR35 QR75 QS16
4C057 AA04 BB02 CC01 DD01 MM04
4D017 AA03 AA13 BA03 CA04 CB01
DA07 DB04 EA03
4D054 FA03 GA01 GA10
4G066 AA22B CA54 DA07 GA39
GA40
4H045 AA20 AA40 FA82 GA01 GA20